

Wiener Tierärztliche Monatsschrift

Separatabdruck aus 57. Jahrg., 1970, Heft 10 (Seite 330—337)

Alle Rechte vorbehalten. Es ist insbesondere nicht gestattet, ohne Genehmigung des Verlages diesen Sonderdruck oder Teile davon nachzudrucken oder auf sonstige Weise zu vervielfältigen. Verlag Brüder Hollinek, Wien.

Versuche zur Verminderung der Hitzeresistenz von Mikroorganismen¹⁾²⁾

Von K. Kniewallner und O. Prändl

Bei der Haltbarmachung von Lebensmitteln hat die Anwendung von Hitze schon von jeher eine wesentliche Rolle gespielt. Einen entscheidenden Fortschritt brachte aber die Entdeckung von *Nicolas Appert* im Jahre 1804, wonach Lebensmittel besonders lange haltbar sind, wenn sie unter hermetischem Abschluß ausreichend erhitzt und gelagert werden. Damit wurde eine Form der Lebensmittelkonservierung kreiert, die für die Lösung zahlreicher Versorgungsprobleme auf dem Lebensmittelsektor von entscheidender Bedeutung ist. Die erste Konservenfabrik wurde im Jahre 1820 in Boston errichtet (57). Sie kann als der Grundstein zu einem der größten Industrie- und Wirtschaftszweige betrachtet werden. Der Umfang der Konservenproduktion ist daraus zu ersehen, daß beispielsweise im Jahre 1965 11,2 Millionen Tonnen Zinnblech für Konservendosen produziert (5) und im Jahre 1962 allein in den USA mehr als eine Million

¹⁾ Referat, gehalten bei der 4. Arbeitstagung der Sektion Lebensmittel tierischer Herkunft der Österreichischen Gesellschaft der Tierärzte am 13. Mai 1970 in Wien.

²⁾ Diese Arbeit stellt den ersten Teil eines Forschungsvorhabens dar, das überwiegend aus Mitteln finanziert wird, die vom United States Department of Agriculture unter P. L. 480 für diesen Zweck zur Verfügung gestellt wurden.

Tonnen Fleischkonserven erzeugt wurden (53). Beim 5. Weltkongreß der Konservenindustrie in Wien (1967) wurde mit Recht darauf hingewiesen, daß eine Versorgung der Weltbevölkerung mit Lebensmitteln ohne Konserven nicht mehr zu bewerkstelligen wäre. So wäre eine ausreichende Versorgung der Bevölkerung in den großen Ballungszentren, weit entfernt von den Lebensmittelgewinnungs- und -produktionsstätten, ohne Konserven kaum möglich. Dem Verbraucher können in Form von Konserven das ganze Jahr über auch solche Lebensmittel zur Verfügung gestellt werden, die nur saisonmäßig anfallen, wie Gemüse, Obst und dergleichen, wodurch auch Schwankungen im Preisgefüge ausgeglichen werden können. Die Konservenindustrie ermöglicht auch eine Vorratswirtschaft, die Überangebot und Mangel weitgehend auszugleichen vermag.

Die technische Entwicklung der Konservenherstellung hat in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte gemacht. Dabei ging es vor allem darum, eine bessere Stabilität, kleinere Verluste und geringere Beeinträchtigungen der Lebensmittel und damit einen höheren Genuß- und Nährwert zu sichern. Man konzentrierte sich dabei vor allem auf technisch-physikalische Probleme, wie Verbesserung des Wärmeganges bei der Sterilisation durch künstliche Konvektion flüssiger oder halbflüssiger Lebensmittel oder durch Hochtemperatur-Kurzzeit-Sterilisation, um Qualitätseinbußen, die bei der üblichen Konservierung bei 115 bis 121° C in Kauf genommen werden müssen, zu verringern. Der Schwerpunkt der Entwicklung lag also auf der Verbesserung der physikalisch-technischen Bedingungen. Trotz aller erreichten technischen Fortschritte und Einhaltung kalkulierter Sterilisationswerte konnte bisher jedoch eine absolute Sicherheit in der Konservenproduktion nicht erreicht werden. Die Verderbnisquote bei Konserven mit etwa 1 bis 5 Dosen pro 10 000 Einheiten ist scheinbar gering, betrachtet man aber die enormen Produktionsziffern, so sind die Verluste doch noch sehr beachtlich. Für die Jahresproduktion von Fleischkonserven in den USA, die ungefähr 2 Milliarden Dosen beträgt (53), berechnet sich ein Verlust, der zwischen 200 000 und 1 000 000 Dosen liegt.

Die Sterilisationstechnik ist nunmehr so vervollkommen, daß eine beachtliche Weiterentwicklung kaum noch vorstellbar ist und die derzeitigen Verluste bereits als erreichbares Minimum angesehen werden.

Die Abtötung der Mikroorganismen bei der Konservenherstellung ist unter anderem von der aktuellen Hitzeresistenz der Keime abhängig. Eine Weiterentwicklung wäre daher auch auf dem Wege der künstlichen Erniedrigung der Hitzeresistenz der in Betracht kommenden Mikroorganismen denkbar. Über eine gezielte Beeinflussung der Widerstandsfähigkeit der Mikroorganismen auch im Rahmen der Lebensmittelkonservierung wurde in der Literatur des öfteren bereits berichtet (2, 22, 23, 28, 29, 31, 32, 35, 36, 50, 60, 61).

Bei der Einwirkung einer bestimmten Temperatur auf eine Bakterienpopulation werden nicht alle vorhandenen Keime gleichzeitig abgetötet, sondern der Absterbevorgang stellt einen zeitlichen Prozeß dar, der durch einen exponentiellen Verlauf gekennzeichnet ist. Als Maß für die Hitzeresistenz gilt jene Zeit, die erforderlich ist, um bei einer gegebenen Temperatur die Anzahl der Keime auf ein Zehntel zu reduzieren. Sie wird als D-Wert (dezimale Reduktionszeit) bezeichnet und nach der Formel von *Halvorson* und *Ziegler* (18):

$$D = \frac{U}{\log a - \log b}$$

ausgedrückt, worin U die Erhitzungsdauer in Minuten, a die Anfangskeimzahl und b die Bakterienzahl, die die Erhitzungsdauer überlebte, bedeuten. Die erforderliche Zeit, um eine bestimmte Anzahl von Mikroorganismen abzutöten, berechnet sich dann als $F = D \times \log a$. Beide Größen sind von der angewendeten Temperatur abhängig.

Die Hitzeresistenz von Mikroorganismen wird von einer Reihe äußerer Faktoren beeinflusst. An erster Stelle ist der Einfluß von Wasser oder der Grad der Feuchtigkeit zu nennen. Es ist bekannt, daß mit zunehmender Trockenheit die Thermoresistenz zunimmt (1, 12, 37, 39, 48, 51, 54). Beachtlich ist aber auch die Resistenz-erhöhung durch osmotischen Wasserentzug. Eine solche ist z. B. bei der Vergärung hochkonzentrierter Zuckerlösungen durch Hefen beobachtet worden (6, 15, 38). In bezug auf die Hitzeresistenz ist nicht so sehr der Ge-

samtwassergehalt wesentlich, als vielmehr die Menge Wasser, die für die Mikroorganismen verfügbar ist. Diese freie Wassermenge ist proportional der sogenannten Wasseraktivität, die durch das Verhältnis zwischen dem Dampfdruck des fraglichen Systems und demjenigen von reinem Wasser ausgedrückt wird. Man kann also sagen, daß die Hitzeresistenz einer Keimart mit steigender Wasseraktivität abnimmt und umgekehrt. Da Lebensmittel, insbesondere aber Fleischwaren, sehr heterogene Systeme darstellen, ist in verschiedenen Teilen dieser Produkte auch mit örtlich unterschiedlichen Wasseraktivitäten zu rechnen. Die Wasseraktivität ist nur ein summarischer Wert mit einem relativ großen Streubereich, sie wäre daher für die Berechnung von Sterilisationsnormen eine unsichere Grundlage.

Von erheblichem Einfluß ist auch der pH-Wert des Milieus auf die Hitzeresistenz der Mikroorganismen (4, 10, 13, 27, 37, 39, 51, 54, 57). Ein genügend saures oder alkalisches Milieu kann allerdings auch schon ohne Anwendung von Hitze letal wirken. Die größte Hitzeresistenz der Bakteriensporen liegt im pH-Bereich von 6,0 bis 8,0 und für Hefen und Schimmel in schwach saurem Milieu (54). Viele Lebensmittel, insbesondere auch Fleischwaren, weisen pH-Werte auf, die zwischen pH 6 und 7 liegen. Neben der pH-Wirkung spielt auch die Art der Säuren eine Rolle. So erniedrigen bei gleichen pH-Werten Mineralsäuren die Hitzeresistenz stärker als organische Säuren (10, 12, 39).

Ein weiterer für die Lebensmittelkonservierung nicht unbeachtlicher Faktor ist der Einfluß von Salzen (3, 7, 10, 12, 13, 19, 22, 23, 29, 39, 40, 60, 61). Die Wirkung von Salzionen ist unterschiedlich. Sie können die Hitzeresistenz erniedrigen, erhöhen oder unbeeinflusst lassen, wobei oft die Konzentration der maßgebende Faktor ist. Kochsalz in Konzentrationen von 2 bis 4% hat eine Schutzwirkung gegenüber Hitzeeinwirkung, während Konzentrationen über 8% die Hitzeresistenz herabsetzen (54). Die Resistenzänderung unter dem Einfluß von Salzen hängt auch weitgehend davon ab, ob die betreffenden Salzionen eine quellende oder entquellende Wirkung auf die Bakterienzelle ausüben (10, 11, 12, 22, 23, 39, 42, 48, 60, 61). Durch quellend wirkende Elektro-

lyte wird die Thermoresistenz erniedrigt, durch entquellende erhöht. Einwertige Kationen wirken meist quellend und damit resistenzvermindernd, während zweiwertige Kationen, vor allem Mg und Ca, entquellend auf das Bakterieneiweiß wirken und dadurch die Hitzebeständigkeit steigern. Nach den Untersuchungsergebnissen sowohl von *Thimann* (55) als auch von *Sugijama* (52) wird die Hitzeresistenz von Sporen durch Mangel an Kalzium- bzw. Magnesiumionen verringert, dagegen erhöhen Eisenionen die Hitzestabilität.

Einige Salze, z. B. Nitrit, bewirken allgemein eine Hemmung bestimmter Keime, eine spezifische Wirkung auf die Hitzeresistenz konnte aber bisher nicht beobachtet werden. Nach der Arbeit von *Wollmann* (61) hatte Natriumnitrit gegenüber *Salmonella typhimurium* nur eine unwesentliche und gegen Rotlauf- und Tuberkulosebakterien keine resistenzvermindernde Wirkung, während Nitritpökelsalz einen resistenzerhöhenden Effekt zeigte. *Michener*, *Thompson* und *Lewis* (32) berichten, daß die Hitzeresistenz von Sporen des Clostridiumstammes PA 3679 durch eine Konzentration von 3000 ppm Natriumnitrit herabgesetzt wird.

Wollmann (61), *Kotter* und *Terplan* (23), *Kelch* und *Bühlmann* (22), *Wirz* (60) und *Manderscheid* (29) haben bei ihren Untersuchungen durch Natriumpyrophosphat bzw. durch Polyphosphatpräparate eine Herabsetzung der Hitzeresistenz bei den verwendeten Testkeimen festgestellt, was auch wir in eigenen Untersuchungen bestätigen konnten. Die Art der Wirkung ist derzeit noch unbekannt, sie könnte ursächlich aber darauf beruhen, daß die Phosphate Erdalkalimetallionen binden, wodurch der Quellungszustand der Bakterienzellen erhöht und damit die Hitzeresistenz vermindert wird. *Wirz* (60) hat in seiner Arbeit eine Quellung des Protoplasmas experimentell demonstrieren können.

Eine gewisse resistenzerhöhende Wirkung wird den Proteinen zugesprochen (1, 45). Allerdings liegen darüber sich widersprechende Ansichten vor. Fest steht lediglich, daß Bakterien in Milch bei einer bestimmten Temperatur (60° C) langsamer absterben als in Ringerlösung, was mit einer gewissen Schutzwirkung der Proteine erklärt wird (58). Wenn jedoch Proteine überhaupt

eine Schutzwirkung ausüben, so kann dies nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen nicht auf eine veränderte Wärmeleitfähigkeit zurückgeführt werden (39). Möglicherweise spielt aber hierbei die Bindung von Wasser und damit eine Erniedrigung der Wasseraktivität eine Rolle.

Dagegen ist eine Schutzwirkung von Fetten und Ölen erwiesen, die auf die geringere Wärmeleitfähigkeit dieser Substanzen zurückgeführt wird. Ein weiterer Faktor sind die hydrophoben Eigenschaften der Fette und Öle, durch welche Grenzflächenverhältnisse geschaffen werden, die den Wärmegang beeinflussen können (2, 5, 42, 48, 50, 51, 62). Bei in Fett inokulierten Keimen kann die erforderliche Zeit zu deren Abtötung ein Vielfaches derjenigen im wässrigen Milieu betragen. Dies dürfte der Hauptgrund dafür sein, daß auch aus ordnungsgemäß erhitzten Konserven gelegentlich Sporenbildner und auch nicht sporenbildende Keime isoliert werden können. Außer der Wärmeisolierung und den hydrophoben Eigenschaften des Fettes werden auch freie Fettsäuren sowie Mono- und Diglyceride für eine indirekte Beeinflussung der Hitzeresistenz verantwortlich gemacht, indem diese Stoffe das Eindringen von Mikroorganismen in das Fett dadurch erleichtern, daß sie die Grenzflächenspannung zwischen Fett und wässriger Phase erniedrigen (33). Auch die mechanische Emulgierung der Fette wirkt in dieser Richtung (62). Da in vielen Lebensmitteln das Fett in Form einer Emulsion vorliegt, insbesondere auch in Fleischwaren, ist das Verhalten von Mikroorganismen in Emulsionen besonders interessant. Darüber hinaus ist auch die Wärmeleitfähigkeit von Emulsionen in Betracht zu ziehen, da anzunehmen ist, daß durch den häufigen Wechsel von wässriger und fettiger Phase auch die Wärmeleitung gegenüber reinem Fett verändert ist. Allerdings liegt über die Wärmeleitfähigkeit von Emulsionen nur wenig Literatur vor, weshalb wir Untersuchungen darüber eingeleitet haben.

Neben den genannten Stoffen, die im allgemeinen die Keimabtötung erschweren, sei es, daß sie die Wärmeleitfähigkeit im Milieu vermindern, oder sei es, daß sie die Hitzeresistenz der Mikroorganismen direkt erhöhen, wurden auch noch bisher nicht näher definierbare

Schutzstoffe beobachtet. So wird die steigende Hitze-resistenz in dichten Bakterienaufschwemmungen einer spezifischen Schutzsubstanz zugeschrieben, die durch Bakterien selbst ausgeschieden werden soll (20, 26, 37, 56). Diese Stoffe lassen sich von den Kulturen abtrennen und sollen, wenn sie anderen Kulturen zugesetzt werden, auch bei diesen zum Teil erhebliche Resistenzsteigerungen verursachen. Da in Lebensmitteln, insbesondere in Fleischwaren, die Verteilung der Keime oft nicht gleichmäßig ist, also nicht in allen Teilen eine gleichmäßige Keimdichte vorliegt, können trotz einer geringen Gesamtkeimdichte lokal hohe Keimdichten vorliegen, für welche dann die geschilderten Bedingungen eventuell zutreffen. Diese Möglichkeit ist neben anderen zu berücksichtigen, wenn kalkulierte Sterilisationswerte nicht zu dem erwünschten Erfolg führen.

Die Hitzeresistenz von Mikroorganismen wird auch vom Alter bzw. Zustand der Zellen beeinflusst. Zellen aus der stationären Phase sind wesentlich resistenter als jene, die sich im Stadium der exponentiellen Vermehrung befinden. Junge Zellen sind demnach empfindlicher als alte (1, 37, 46). Im Hinblick auf die Sporen hat sich trotz vieler Versuche eine einheitliche Auffassung nicht herauskristallisiert, so daß gegensätzliche Meinungen bestehen (51).

Ein für die Konservenherstellung beachtliches Phänomen ist das nach dem Erhitzen zu beobachtende Latenz-Stadium der vegetativen Keime und Sporen. Die Mikroorganismen sind offenbar infolge einer Hitzeschädigung nicht in der Lage, im Lebensmittel selbst sich zu vermehren bzw. auszukeimen, während in optimalen Nährmedien und unter optimaler Temperatur die Vermehrungsfähigkeit wieder zurückgewonnen werden kann. Das Latenz-Stadium ist vor allem durch eine Abnahme der Atmung der Bakterienzellen gekennzeichnet. Man nimmt an, daß das Latenz-Stadium einerseits durch partielle Schädigung des Enzymsystems und andererseits durch giftige Intermediärprodukte verursacht wird.

Über die Hitzeresistenz von Mikroorganismen und insbesondere auch über die Faktoren, welche die Hitze-resistenz erhöhen, liegt ein umfangreiches Schrifttum vor. Im Vergleich dazu sind nur wenige Mitteilungen

über eine wirksame Herabsetzung der Hitzeresistenz gemacht worden.

Wir führen nun seit mehreren Jahren Untersuchungen darüber durch, ob durch irgendwelche Substanzen die Hitzeresistenz von Mikroorganismen erniedrigt werden kann. Natürlich werden dabei in erster Linie solche Stoffe ausgewählt, die als Zusatzstoffe zu Lebensmitteln tolerierbar sein könnten. Für Studienzwecke werden aber auch andere Substanzen mit einbezogen. Als Kriterium wird vorausgesetzt, daß die verwendeten Stoffe nicht schon an sich Hemmstoffe sind, d. h., daß sie innerhalb einer bestimmten Zeit keine Hemmwirkung bei der üblichen Züchtung von Bakterien entfalten. Eine strenge Grenze läßt sich aber diesbezüglich nicht ziehen.

Es wurden bisher über 40 Substanzen getestet, die nach verschiedenen Gesichtspunkten ausgewählt worden waren. Eine Gruppe umfaßt verschiedene Säuren, wie Ascorbinsäure, Zitronensäure, Elaidinsäure, Fumarsäure, Glykolsäure, Laevulinsäure, Ölsäure u. a. Die Untersuchungen wurden so durchgeführt, daß eventuelle spezifische Wirkungen des Säurerestes evident wurden, also eine reine pH-Wirkung ausgeschlossen blieb. Eine weitere Gruppe von Substanzen bestand aus Salzen, wie verschiedene Laktate, Zitate, Azetate, ferner die Natriumsalze der Glutaminsäure, Metaphosphorsäure sowie Pyrophosphorsäure und außerdem Propylgallat und Laurylgallat. Ferner wurden auch Inosit, L-Asparagin, Azetoin, Hylak, das ist ein Stoffwechselprodukt von Milchsäurebakterien, dann auch bereits übliche Zusatzstoffe wie Glukonsäure-d-Lakton und dergleichen geprüft. Schließlich wurden auch Fermente in die Untersuchungen einbezogen, und zwar Zitropepsin, Hexokinase, Hyaluronidase, Lysozym, Kokarboxylase, Papain, Ribonuklease und eine Reihe proteolytischer Fermentgemische.

Als Testkeime wurden *Streptococcus faecium* und *Staphylococcus aureus* SG 511 verwendet. *Sc. faecium* wurde deshalb gewählt, weil dieser Keim zu den hitzeresistentesten vegetativen Keimen zählt, die in Fleischwaren vorkommen. *Staph. aureus* interessierte vor allem im Hinblick auf das Überleben in wenig erhitzten Fleischwaren und als Vergleichskeim.

Die Untersuchungen wurden wie folgt durchgeführt: 1%iger Traubenzuckerbouillon mit Bromkresolpurpur als Indikator wurde jeweils eine bestimmte Menge einer 24 Stunden alten Testkultur zugesetzt, die unmittelbar vorher in einem sterilen Gerät kurzfristig homogenisiert worden war. Nach kräftigem Schütteln wurde ein Teil der Traubenzuckerbouillon als Kontrolle und zur Bestimmung der Ausgangskeimzahl verwendet, während dem übrigen Teil die Testsubstanzen zugesetzt wurden. Von den Kontrollen und Ansätzen wurden jeweils 2 ml in Pyrex-Glasröhrchen abgefüllt, zugeschmolzen und in einem Schüttelwasserbad verschieden lange Zeit bei 50 bis 60° C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Ansätze bei 37° C bebrütet. Mit den als wirksam erkannten Substanzen wurden weitere Erhitzungsteste in Eprouvetten durchgeführt und Keimzahlbestimmungen nach dem Gußplattenverfahren vorgenommen. Als Nährmedien wurden Trypton-Traubenzucker-Hefenextrakt-Agar, zum Teil auch Kanamycin-Agar, Thalliumazetat-Agar u. a. verwendet. Die Nährböden wurden bei 37° bzw. 45° C bebrütet und weiterhin bei Zimmer-temperatur auf Keimwachstum beobachtet.

Bei beiden verwendeten Erhitzungsmethoden wurde jeder Ansatz 5fach vorgenommen und daraus Mittelwerte berechnet oder nötigenfalls eine Versuchsserie mehrmals wiederholt. Beide Methoden sind nicht frei von Störungen, insbesondere können bei der Erhitzung vermehrt Keime dann überleben, wenn diese über dem Flüssigkeitsspiegel dem Glasrand anhaften und nachträglich wieder in das Medium gelangen. Dieser Mangel konnte dadurch verringert werden, daß die Erhitzung im Schüttelwasserbad erfolgte, wobei auch Unregelmäßigkeiten im Wärmegang auszuschalten waren. Aber auch unter diesen Bedingungen ergeben die Untersuchungen in zugeschmolzenen Pyrex-Röhrchen noch erhebliche Fehlerbereiche, da bei den angewendeten Erhitzungstemperaturen die totale Abtötung und das Überleben nur weniger Keime über einen breiten Zeitintervall streuen. Zuverlässigere Ergebnisse mit besserer Reproduzierbarkeit ergibt die Eprouvettenmethode mit anschließender Keimzählung. An Hand der ermittelten Keimzahlen können Überlebenskurven aufgestellt und die dezimalen Reduktionszeiten berechnet werden.

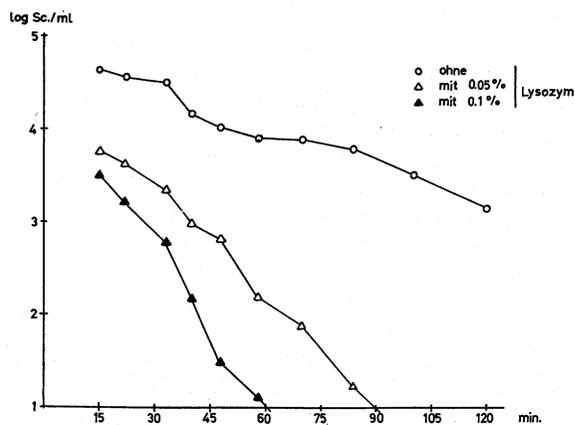


Abb. 1. Wirkung von Lysozym auf die Hitzeresistenz von *Sc. faecium* bei 55° C.

Von den geprüften Substanzen haben einige in den Voruntersuchungen eine Erniedrigung der Hitzeresistenz der Testkeime bewirkt. In diesem Sinne waren insbesondere Lysozym, Laurylgallat, Propylgallat, Na-Pyrophosphat und Na-Metaphosphat wirksam. Eine geringe Wirkung war auch bei Cocarboxylase und Acetoin angedeutet, die Reproduzierbarkeit ließ jedoch zu wünschen übrig. Eine verstärkte Wirkung war teilweise durch Kombination der als wirksam erkannten Substanzen erzielt worden.

Im einzelnen konnten wir folgendes feststellen: Lysozym erniedrigt deutlich die Hitzeresistenz von *Sc. faecium* bei 55° C. Die dezimale Reduktion, kurz als „D-Wert“ bezeichnet, beträgt in diesem Falle für den Kontrollansatz 77, in Gegenwart von 0,05% Lysozym 29 und bei 0,1% Lysozym 20. Die Reduktion ist somit als beträchtlich zu bezeichnen (Fig. 1).

Der Auflösung geht eine starke Quellung der Bakterienzelle voraus, die für sich schon ausreichen dürfte, um die Hitzeresistenz von *Sc. faecium* zu verringern. Das Aktivitätsoptimum von Lysozym liegt bei 54° C, wie auch Roeder und Witzhausen (43) festgestellt haben, die die Hitzeabtötung von Mikroorganismen in Eiklar studierten, in dem auch Lysozym enthalten ist. Bei 20° C

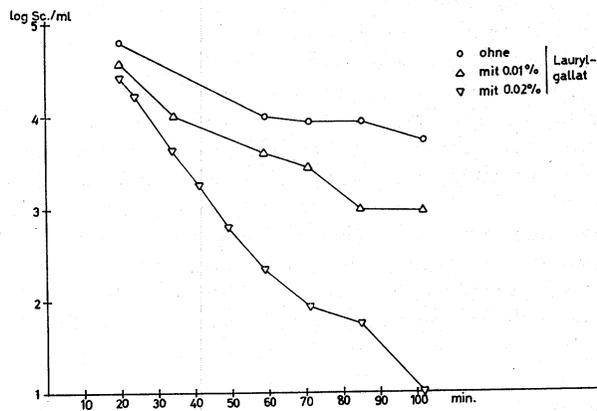


Abb. 2. Wirkung von Laurylgallat auf die Hitzeresistenz von *Sc. faecium* bei 55° C.

konnte man im Verlaufe einiger Stunden keine Beeinträchtigung der Keime beobachten.

Eine gute Wirkung zeigte auch Laurylgallat, insbesondere bei einer Konzentration von 0,02%. Der D-Wert betrug hierbei 25, bei 0,01% Laurylgallat aber noch 57, während die Kontrolle einen D-Wert von 76 aufwies

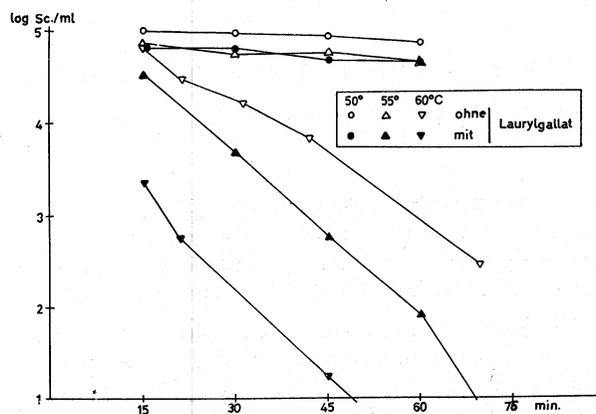


Abb. 3. Wirkung von Laurylgallat (0,02%) auf die Hitzeresistenz von *Sc. faecium* bei verschiedenen Temperaturen.

(Fig. 2). In bezug auf die Wirksamkeit bei verschiedenen Temperaturen wurde festgestellt, daß bei 50° C kein Effekt vorhanden war, während bei 55° C eine ausgeprägte Wirkung vorlag. Bei 60° C war zwar der Unterschied noch deutlich, die D-Werte sind aber in dem beobachteten Zeitraum im Vergleich zur Kontrolle nicht mehr beachtlich, was besagt, daß bei 60° C die Testkeime auch in Abwesenheit von Laurylgallat relativ rasch reduziert werden (Fig. 3). Im Verlaufe einer mehrtägigen Einwirkung bei Zimmertemperatur war ein Effekt gegenüber *Sc. faecium* nicht zu beobachten. Laurylgallat ist nur wenig wasser-, jedoch gut fettlöslich. Es wird als Antioxydans in der Lebensmittelindustrie

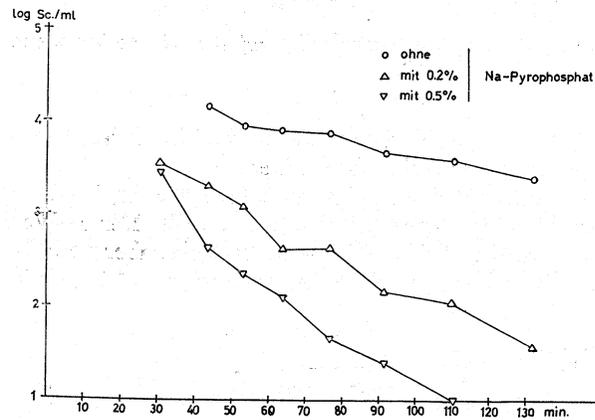


Abb. 4. Wirkung von Na-Pyrophosphat auf die Hitzeresistenz von *Sc. faecium* bei 55° C.

verwendet. Bei Untersuchungen, die später durchgeführt wurden, traten nach Zusätzen von Laurylgallat und auch Propylgallat zu flüssigen und festen Emulsionen schwach graue bis zart bläuliche Farbanomalien auf.

Die Literaturberichte, wonach Pyrophosphat die Hitzeresistenz von Mikroorganismen erniedrigt, konnten wir auch für *Sc. faecium* bestätigen. Allerdings bleibt die Wirkung hinter derjenigen von Lysozym und Laurylgallat zurück. Die D-Werte betragen hier nur 51 bei der niedrigeren und 35 bei der höheren Konzentration.

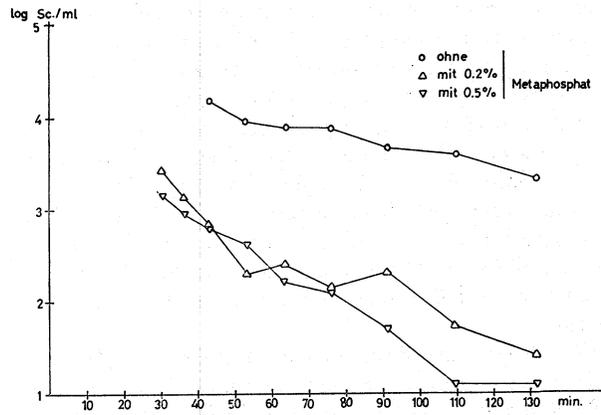


Abb. 5. Wirkung von Na-Metaphosphat auf die Hitzeresistenz von *Sc. faecium* bei 55°C.

Ähnliche Ergebnisse waren auch mit Na-Metaphosphat zu erzielen (Fig. 4 und 5). Beide Phosphate beeinträchtigten *Sc. faecium* weder bei 20° C noch bei 37° C.

In weiteren Untersuchungen wurde die Wirkung von Kombinationen der genannten Substanzen geprüft, und zwar wurden jeweils Lysozym und Laurylgallat zusam-

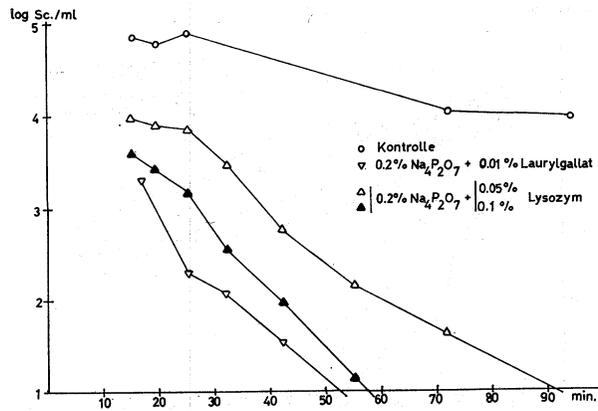


Abb. 6. Wirkung von Laurylgallat und von Lysozym jeweils in Kombination mit Pyrophosphat auf die Hitzeresistenz von *Sc. faecium* bei 55°C.

men mit Pyrophosphat angewendet. Dabei stellte sich heraus, daß Pyrophosphat die Wirkung von Lysozym bzw. Laurylgallat synergistisch verstärkt. Die D-Werte liegen, wenn man die angewendete Konzentration dieser Substanz berücksichtigt, signifikant unterhalb derjenigen von Lysozym bzw. Laurylgallat allein (Fig. 6). Durch die Kombination mit Pyrophosphat kann also mit erheblich geringeren Konzentrationen an Lysozym und Laurylgallat ein beachtlicher Effekt erreicht werden. Die kombinierte Anwendung von Lysozym und Laurylgallat hat jedoch keine verstärkte Wirkung erkennen lassen.

Wie bereits erwähnt, wurden auch mit Staph. aureus SG 511 Untersuchungen durchgeführt. Eine besondere Schwierigkeit ist dadurch gegeben, daß Staph. aureus sehr hitzeempfindlich ist und daher nur in einem sehr engen Temperaturbereich Unterschiede evident werden. Als zweckmäßige Erhitzungstemperatur hat sich eine solche von 50° C erwiesen. Bemerkenswert ist die Beobachtung, daß weder Lysozym noch Laurylgallat die Hitzeempfindlichkeit von Staph. aureus wesentlich beeinflußt hat. Die D-Werte der Versuchsserie lagen zwischen 20 und 35, während die Kontrollen D-Werte von 30 bis 40 aufwiesen. Der Unterschied ist somit nur geringgradig. Da-

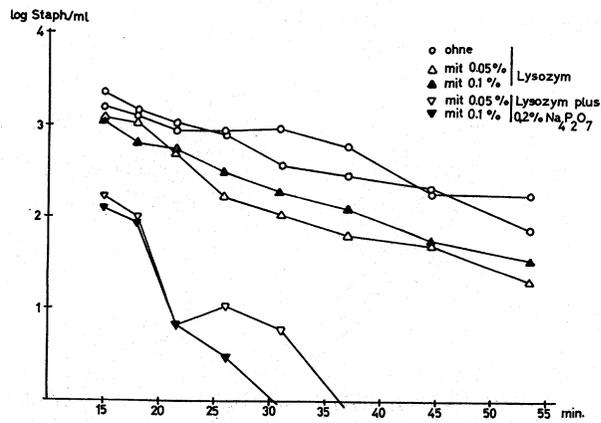


Abb. 7. Wirkung von Lysozym sowie von Lysozym plus Pyrophosphat auf die Hitzeresistenz von Staph. aureus SG 511 bei 50° C.

gegen war mit der Kombination von Lysozym und Pyrophosphat auch bei *Staph. aureus* eine deutliche Sensibilisierung der Keime zu beobachten (Fig. 7). Die D-Werte betragen für diese Kombination etwa 10, während sie für Lysozym allein um 20 und für Kontrollen zwischen 30 und 40 liegen.

Im Rahmen anderer Untersuchungen wurde das Verhalten von Mikroorganismen gegenüber Erythrozytenextrakten studiert. Die Extrakte wurden mit verschiedenen Extraktionsmitteln, wie Azeton, Chloroform, Äthanol und Methanol hergestellt. Diese Extrakte wurden auch in Erhitzungsversuchen auf ihre Wirkung bei verschiedenen Testkeimen überprüft. Dabei wurde festgestellt, daß bestimmte Extrakte ebenfalls die Abtötungsquote von *Sc. faecium* erhöhen (Fig. 8). In

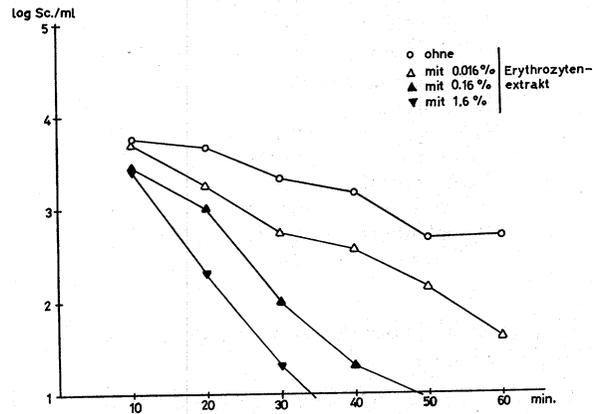


Abb. 8. Wirkung von Erythrozytenextrakt auf die Hitze-resistenz von *Sc. faecium* bei 60° C.

Gegenwart von Erythrozytenextrakten erhitzte, jedoch überlebende Streptokokken wiesen auch eine wesentlich längere Erholungsphase auf als diejenigen aus den Kontrollansätzen. Auch davon kann eine stärkere Hitzeschädigung abgeleitet werden. Möglicherweise handelt es sich dabei um enzymatische Wirkungen. Die Versuche werden noch fortgesetzt.

Tab. 1. Dezimale Reduktion (D-Werte) von *Sc. faecium* bzw. *Staph. aureus* bei Erhitzungsversuchen.

Sc. faecium (55° C):		
Kontrollen:		76—101
Lysozym	0,05%	29
Lysozym	0,1 %	20
Laurylgallat	0,01%	57
Laurylgallat	0,02%	14—25
Na-Pyrophosphat	0,2 %	52
Na-Pyrophosphat	0,5 %	35
Na-Metaphosphat	0,2 %	51
Na-Metaphosphat	0,5 %	50
Pyrophosphat	0,2 %	
+ Lysozym	0,05%	23
Pyrophosphat	0,2 %	
+ Lysozym	0,1 %	18
Pyrophosphat	0,2 %	
+ Laurylgallat	0,01%	14
Staph. aureus (50° C):		
Kontrollen:		27—40
Lysozym	0,05%	21
Lysozym	0,1 %	23
Pyrophosphat	0,2 %	
+ Lysozym	0,05%	11
Pyrophosphat	0,2 %	
+ Lysozym	0,1 %	7

Eine Übersicht über die D-Werte der Untersuchungen gibt die Tabelle 1.

Von den Ergebnissen dieser Untersuchungen kann abgeleitet werden, daß die Hitzeresistenz von Mikroorganismen durch geeignete Substanzen erniedrigt werden kann. Es bleibt allerdings noch zu prüfen, ob dies auch unter den Milieubedingungen möglich ist, wie sie in Lebensmitteln verschiedener Art gegeben sind. Für Natriumpyrophosphat wurde diesbezüglich allerdings schon der Beweis durch *Wollmann* (61) für Fleischwaren und später durch *Ruf* (44) bei Schmelzkäse erbracht. Fernziel der Arbeit ist es, durch wirksame und unschädliche Substanzen mit relativ niedrigen Erhitzungstemperaturen und annehmbaren Erhitzungszeiten bei Lebens-

mitteln einen verbesserten Konservierungseffekt zu erzielen. Wir denken dabei nicht so sehr an die herkömmliche Konservenherstellung, da bei Konserven, die für eine lange Lagerung bestimmt sind, neben den Mikroorganismen auch die vorhandenen Enzyme weitgehend inaktiviert werden müssen. Eine gewisse Stabilisierung wäre aber auch hierbei vorstellbar. Als eigentliches Anwendungsgebiet kämen vor allem jene Fleischwaren in Betracht, die in wasserdampf- und nahezu gasundurchlässigen Umhüllungen erhitzt und in Verkehr gebracht werden, also jene Produkte, die als konservenähnliche Lebensmittel zu bezeichnen sind. Da Fleischwaren mit solchen Umhüllungen wegen der zu geringen Druckfestigkeit in gewöhnlichen Autoklaven nicht sterilisiert werden können, würde durch eine gezielte Erniedrigung der Hitzeresistenz der vorhandenen Mikroflora die Stabilität solcher Produkte wesentlich erhöht werden können. Ob dies auf dem aufgezeigten Wege möglich sein wird, muß sich aber erst noch erweisen.

Zusammenfassung

Es wurden bisher über 40 verschiedene Substanzen auf eine thermoresistenzvermindernde Wirkung gegenüber *Sc. faecium* und *Staph. aureus* SG 511 geprüft. Die Erhitzungstemperaturen der in Traubenzuckerbouillon getesteten Keime betragen 50 bis 60° C. Lysozym in Konzentrationen von 0,1 und 0,05%, Laurylgallat und Propylgallat in Konzentrationen von 0,02 und 0,01%, Na-Pyrophosphat und Na-Metaphosphat in Konzentrationen von 0,5 und 0,2% sowie Kombinationen von Lysozym und Pyrophosphat bzw. Pyrophosphat und Laurylgallat ließen einen resistenzmindernden Effekt gegenüber *Sc. faecium* erkennen. Mit Erythrozytenextrakten durchgeführte Versuche hatten ebenfalls eine sensibilisierende Wirkung auf *Sc. faecium* gegenüber thermischen Einflüssen. *Staph. aureus* wurde bei einer Temperatur von 50° C weder durch Lysozym noch durch Laurylgallat wesentlich beeinflusst. Jedoch war durch die kombinierte Anwendung von Lysozym und Pyrophosphat eine deutliche Sensibilisierung der Keime zu beobachten.

Summary

Kniewallner, K., and Prändl, O.: Studies on the Reduction of Thermal Resistance of Microorganisms.

Experiments were conducted to study the effect of various substances on the heat resistance of *Sc. faecium* and *Staph. aureus* SG 511. Tests organism were cultured in glucose broth and exposed to temperatures ranging from 50° to 60° C. Reduction of heat resistance of *Sc. faecium* was obtained with the use of following substances: lysozyme in a concentration from 0,1 to 0,05%; lauryl gallate and propyl gallate in a concentration from 0,02 and 0,01%; sodium pyrophosphate and sodium methaphosphate in a concentration of 0,5 and 0,2%; lysozyme and pyrophosphate, and pyrophosphate and lauryl gallate in combination. Erythrocyte extract also increased the sensitivity of *Sc. faecium* to heat. At 50° C, lysozyme and lauryl gallate alone failed to produce appreciable effect upon *Staph. aureus*. On the other hand, significant reduction of thermal resistance of the germs was obtained with the use of lysozyme and pyrophosphate in combination.

Literatur

- (1) *Amaba, M., und Sakaguchi, K. J.:* J. Bact. 68 (1954): 338.
- (2) *Andersen, A. A., und Michener, H. D.:* Food Technol. 4 (1950): 188.
- (3) *Anderson, E. E., Esselen, W. B., und Fellers, C. R.:* Food Res. 14 (1949): 499.
- (4) *Anderson, E. E., Esselen, W. B., und Handleman, A. R.:* Food Res. 18 (1953): 40.
- (5) *Autret, M.:* Ref. Fleischwirtschaft 48 (1968): 638.
- (6) *Baumgartner, J. G.:* J. Bact. 36 (1938): 369.
- (7) *Bergmann, G., und Seidl, G.:* Arch. Lebensmittelhyg. 8 (1957): 30.
- (8) *Curran, H. R.:* J. Bact. 27 (1934): 26.
- (9) *Curran, H. R., und Evans, F. R.:* J. infect. Dis. 99 (1956): 212.
- (10) *Eisenberg, Ph.:* Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 82 (1919): 69.
- (11) *El-Bisi, H. M., und Ordal, Z. J.:* J. Bact. 71 (1956 a): 1.
- (12) *Esche, P., Vor Dem:* Arch. f. Hyg. u. Bakt. 137 (1953): 26 und 487.
- (13) *Esty, J. R., und Meyer, K. F.:* J. inf. Dis. 31 (1922): 650.
- (14) *Evans, F. R., und Curran, H. R.:* Food Res. 13 (1948): 13.
- (15) *Fabian, F. W., und Hall, H. H.:* Zbl. Bakt. II. Abt. 89 (1933): 31.
- (16) *Ficker, M.:* Zschr. f. Hyg. u. Inf. Krankh. 59 (1908): 367.
- (17) *Frazier, W. C.:* Food Microbiology. Mc. Graw-Hill Book Company. Inc. New York-Toronto-London 1958, S. 93.
- (18) *Halvorson, H. O., und Ziegler, N. H.:* J. Bact. 25 (1933): 101.
- (19) *Headlee, M. R.:* J. inf. Dis. 48 (1931): 328.
- (20) *Hückel, R.:* Z. Hyg. 106 (1926): 730.
- (21) *Ingram, M.:* Ann. Inst. Pasteur Lille 7 (1955): 146.
- (22) *Kelch, F., und Bühlmann, X.:* Fleischwirtschaft 5 (1958): 325.

— (23) Kosker, O., Esselen, W. B., und Fellers, C. R.: Food Res. 16 (1951) : 510. — (24) Kotter, L., und Terplan, G.: Arch. Lebensmittelhyg. 9 (1958) : 60. — (25) Lang, O. W., und Dean, S. J.: J. infect. Dis. 55 (1934) : 39. — (26) Lange, B.: Z. Hyg. 96 (1922) : 249. — (27) Levine, A. S., und Fellers, C. R.: J. Bact. 39 (1940) : 499. — (28) Lewis, J. C., Michener, H. D., Stumbo, C. R., und Titus, D. S.: J. Agr. Food Chem. 2 (1954) : 298. — (29) Manderscheid, H.: Vet. Diss. München (1964). — (30) Meyer, K. F., und Lang, O. W.: J. inf. Dis. 39 (1926) : 321. — (31) Michener, H. D.: J. Bact. 70 (1955) : 192. — (32) Michener, H. D., Thompson, P. A., und Lewis, J. C.: Appl. Microbiol. 7 (1959) : 166. — (33) Mudd, S., und Mudd, E.: Zit. nach Hansen, N. H., und Riemann, H.: J. Appl. Bacteriol. 26 (1963) : 314. — (34) Nichols, A. A.: J. Dairy Res. 11 (1940) : 274. — (35) O'Brien, R. T., und Titus, D. S.: J. Bact. 70 (1955) : 487. — (36) O'Brien, R. T., Titus, D. S., Devlin, K. A., Stumbo, C. R., und Lewis, J. C.: Food Technol. 10 (1956) : 352. — (37) Ørskov, S. L.: Z. Hyg. 105 (1926) : 317. — (38) Owen, W. L.: Zbl. Bakt. II. Abt. 39 (1913) : 468. — (39) Precht, H., Christophersen, J., und Hensel, H.: Temperatur und Leben. Springer-Verlag. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955, S. 237. — (40) Reimers, H.: Zschr. f. Fleisch- und Milchhyg. 23 (1912) : 6 und 29.. — (41) Reynolds, H., und Lichtenstein, H.: Bacteriol. Proc. 1950 (1950) : 28. — (42) Rodenbeck, H.: Arch. Hyg. 109 (1933) : 67. — (43) Roeder, G., und Witzhausen, R.: Arch. Lebensmittelhyg. 18 (1967) : 265. — (44) Ruf, F.: Milchwissenschaft 13 (1958) : 292. — (45) Russel, H. L., und Hastings, E. G.: Zbl. Bakt. II. Abt. Orig. 53 (1921) : 284. — (46) Schultz, J. H., und Ritz, H.: Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 54 (1910) : 283. — (47) Sherman, J. M., und Albus, W.: J. Bact. 8 (1923) : 127. — (48) Slesarewski, W.: Zschr. f. Fleisch- und Milchhyg. 42 (1931) : 30. — (49) Stark, N. C., und Stark, P.: J. Bact. 18 (1929) : 333. — (50) Stritzinger, H.: Vet. Diss., Gießen (1953). — (51) Stumbo, C. R.: Thermobacteriology in Food Processing. Academic Press, New York und London, 1965. — (52) Sugijama, H.: J. Bact. 62 (1951) : 81. — (53) Sulzbacher, W. L.: Persönliche Mitteilung. — (54) Sykes, G.: Disinfection and Sterilisation. Second Edition. E. & F. N. Spon Ltd, London 1965, S. 109 ff. — (55) Thimann: Zitiert nach R. Dickscheit in Handbuch der mikrobiologischen Laboratoriumstechnik. 2. Auflage. Verlag Theodor Steinkopff, Dresden 1962, S. 10. — (56) Watkins, J. H., und Winslow, C. E. A.: J. Bact. 24 (1932) : 243. — (57) Weiser, H. H.: Practical Food Microbiology and Technology. The AVI Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut 1962, S. 72. — (58) White, H. R.: Proc. Soc. Appl. Bact. 15 (1952) : 8. — (59) Williams, T. F.: J. Bact. 32 (1936) : 589. — (60) Wirz, K. H.: Vet.

Diss., München (1961). — (61) *Wollmann, E.*: Vet. Diss., München (1957). — (62) *Zuccaro, J. B., Powers, J. J., Morse, R. E., und Mills, W. C.*: Food Res. 16 (1951) : 325.

Anschrift der Verfasser: Dr. Karl Kniewallner und o. Hochschulprof. Dr. Oskar Prändl, Linke Bahngasse 11, A-1030 Wien.